

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-197500  
(P2000-197500A)

(43) 公開日 平成12年7月18日 (2000.7.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/48	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 P 29/00		A 6 1 K 31/00	6 2 9 4 B 0 2 4
37/06			6 3 7 D 4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00		45/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/99	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-26803

(22) 出願日 平成11年2月4日 (1999.2.4)

(31) 優先権主張番号 特願平10-26003

(32) 優先日 平成10年2月6日 (1998.2.6)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平10-309316

(32) 優先日 平成10年10月30日 (1998.10.30)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002956

田辺製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

(72) 発明者 杉田 尚久

奈良県奈良市西登美ヶ丘3丁目3番9号

(72) 発明者 櫻井 宏明

兵庫県三田市すずかけ台4丁目6番地3番  
館602号

(72) 発明者 ▲陰▼山 法子

茨城県日立市石名坂町1-19-4-301

(74) 代理人 100076923

弁理士 箕浦 繁夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TAK1を標的とするNF- $\kappa$ B活性化抑制薬及びその同定方法

(57) 【要約】

【課題】 新しい伝達分子に焦点をあてたNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、自己免疫疾患などの治療薬・予防薬、及び、それらの新規な同定方法及びスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 TAK1 (TGF- $\beta$ アクチベーターキナーゼ1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法。NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び/又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法。また、前記方法によって選択又は同定された新規なNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 TAK1 (TGF- $\beta$ アクチベーターキナーゼ1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法。

【請求項2】 被験物質の変調作用が、TAK1の機能を阻害又は抑制する作用である請求項1記載の方法。

【請求項3】 TAK1の機能が、(1) TAK1とTAK1結合蛋白質1との相互作用、(2) TAK1のプロテインキナーゼ活性、(3) 細胞内のTAK1によるIKK複合体の活性化、及び(4) 細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化から選択されるものである、請求項2記載の方法。

【請求項4】 TAK1の機能が、TAK1のプロテインキナーゼ活性である請求項2記載の方法。

【請求項5】 TAK1の機能が、細胞内のTAK1によるIKK複合体の活性化である請求項2記載の方法。

【請求項6】 TAK1とTAK1結合蛋白質1とを発現増強させた試験用細胞を用い、試験用細胞を被験物質と共存させる工程を含む請求項1記載の方法。

【請求項7】 NF- $\kappa$ B活性化抑制薬が同時に自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか1項記載の方法により、選択又は同定された、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬。

【請求項9】 TAK1の機能を変調させる薬物を主成分とするNF- $\kappa$ B活性化抑制薬。

【請求項10】 NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項10の方法により、選択又は同定された自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬。

【請求項12】 NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能を阻害又は抑制する作用を有する薬物を主成分とする、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬・予防薬に関する。また、それらの新規なスクリーニング方法及び同定方法に関する。

## 【0002】

## 【0003】

【従来の技術】 転写因子の一つとして知られるNF- $\kappa$

B (Nuclear Factor kappa B) は、炎症や免疫応答に関与する種々の遺伝子の転写調節において重要な役割を果たしている。通常、NF- $\kappa$ Bは、細胞質内では、制御タンパク質であるI $\kappa$ Bと結合した不活性な複合体として存在しているが、細胞に一定の刺激が与えられると、I $\kappa$ Bが修飾・分解を受け複合体からはずれることにより活性化される。このように活性化されたNF- $\kappa$ Bは、核内へ移行し、ゲノムDNA上の種々の遺伝子の上流域(エンハンサー領域)に存在する特異塩基配列(約10塩基からなるNF- $\kappa$ B結合配列)と結合して、遺伝子の転写を活性化する。NF- $\kappa$ B結合配列は、免疫グロブリン遺伝子の他、IL-1、腫瘍壊死因子等の炎症性サイトカイン、インターフェロン、細胞接着因子等の遺伝子上流域にも存在し、NF- $\kappa$ Bは、これら遺伝子の発現誘導を介して、炎症や免疫応答に関与している。

【0004】 NF- $\kappa$ Bは、自己免疫疾患や炎症性疾患の病態形成にも関っており、NF- $\kappa$ Bの活性化抑制作用を有する薬物は、自己免疫疾患(慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、ベーチェット病、結節性動脈周囲炎、潰瘍性大腸炎、糸球体腎炎など)、炎症症状を呈する難治性疾患(変形性関節症、アテローム硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎など)、各種ウイルス性疾患、エンドトキシンショック、敗血症、などの疾患の治療及び予防に効果を示すことが知られている。そして、これら疾患の治療・予防薬開発のために、新規なNF- $\kappa$ Bの活性化抑制薬の探索研究が進められている(Koppら、Science、第265巻、第956頁、1994年； Baeuerleら、Advances in Immunology 第65巻、第111～137頁、1997年； 特開平7-291859； 特開平9-227561)。

【0005】 従来のNF- $\kappa$ B活性化抑制薬の探索研究においては、薬物のスクリーニング方法あるいは同定方法としては、インビトロで細胞を刺激の存在下(もしくは非存在下)、被験薬物の存在下もしくは非存在下に培養し、NF- $\kappa$ Bの活性化を検出する方法が一般に用いられている。

【0006】 しかしながら、細胞が一定の刺激(シグナル)を受けてから、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るまでのシグナル伝達経路には、プロテインキナーゼなどの各種伝達分子が関わる多くのステップの存在が考えられる。従って、より効率的な創薬研究のためには、主要な役割を果たす伝達分子を明らかにした上でそれらに焦点を絞った新しい薬物スクリーニング方法を確立することが望まれる。しかし、NF- $\kappa$ Bの活性化のメカニズムは、幾つかの伝達因子(TRAF2 (TNF- $\alpha$  receptor associated factor 2)、MAPKKKの一つであるNIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase)、I $\kappa$ Bキナーゼ(IKK)、ユビキチン共役酵素、26Sプロテオソーム等)が同定されるなど、少しずつ解明されつつあるものの(Nikolaiら、Nature、第385巻、第540～544頁； Ma

niatis, Science, 第278巻、第818～819頁、1997年; Baueurleら、Advances in Immunology 第65巻、第111～137頁、1997年)、いまだ不明な点が多く、より進んだメカニズムの解明と新しい伝達分子に焦点をあてたスクリーニング方法が望まれていた。

【0007】一方、TGF- $\beta$ アクチベーターキナーゼ1 (Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1; TAK1とも称する)は、哺乳動物のMAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) の一つとして見出されたものである (Yamaguchiら、Science, 第270巻、第2008～2011頁、1995年; 特開平9-163990)。TAK1は、TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) によって制御されるPAI-1プロモータを活性化する。また、その命名の由来ともなっているようにTGF- $\beta$ によって活性化を受けることから、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバーによるシグナルの細胞内伝達経路において作用していると考えられてきた。

【0008】また、TAK1は、TAK1結合蛋白質1 (TAK1 binding protein 1; TAB1とも称する)と結合 (相互作用) することにより活性化形となり、シグナル伝達経路においてMAPKKKとして機能することが知られている (Shibuyaら、Science, 第272巻、第1179～1182頁、1996年)。しかしながら、TAK1とNF- $\kappa$ B活性化との関連については何ら知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、新しい伝達分子に焦点をあてたNF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法およびスクリーニング方法を提供することにある。また、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬の新規な同定方法およびスクリーニング方法を提供することにある。

【0010】さらに、前記方法によって得られる新規なNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトのTAK1 cDNAの3つのアレル変異体 (variant) を単離し、さらに、これらを用いた研究の中で、ヒトTAK1をTAB1と共に発現増強 (over expression) させることにより、NF- $\kappa$ Bの活性化が起こることを見出した。またTAK1は、TAB1と相互作用するとともに、IKK (I $\kappa$ Bキナーゼ) 複合体と相互作用しその活性化に関与すること、さらに、キナーゼ活性を失った変異型のTAK1は、NF- $\kappa$ B活性化を阻害することを見出した。

【0012】これらの知見から、TAK1が、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るシグナル伝達経路 (NF- $\kappa$ B活性化

経路) 中の重要な伝達分子であり、TAK1の機能を抑制する薬物はNF- $\kappa$ Bの活性化抑制薬となり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】すなわち、本発明は、TAK1 (TGF- $\beta$ アクチベーターキナーゼ1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法である。

【0014】また、NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法である。

【0015】さらに、前記方法によって選択又は同定された新規なNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬である。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明において用いるTAK1は、いずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、モルモットなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。

【0017】TAK1のcDNA配列およびアミノ酸配列はすでに報告されている (Genbank/EMBL データベース Accession No. D76446; Yamaguchiら、Science, 第270巻、第2008～2011頁、1995年)。また、後記配列表の配列番号3、4及び5には、発明者らが新たに見出したヒトのTAK1 cDNAの3つのアレル変異体 (variant) のDNA配列及びそれらにコードされるTAK1のアミノ酸配列を示した。

【0018】前記の通り、発明者らが独自に見出した知見によれば、TAK1は、NF- $\kappa$ B活性化経路において、主要な伝達分子として機能する。

【0019】TAK1は、細胞内でTAB1 (TAK1結合蛋白質1) と相互作用 (結合) することによって活性化され、プロテインキナーゼ活性 (MAPKKK活性) を示す活性型となるが、この相互作用により自己リン化とTAB1のリン酸化を生じる。また、TAK1はIKK複合体とも機能的に相互作用する。活性化されたTAK1は、IKK複合体を活性化して、NF- $\kappa$ B活性化経路における伝達分子としての機能を発揮し、NF- $\kappa$ B活性化を誘導すると考えられる。

【0020】NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能の模式図を図9に示した。

【0021】本発明においては、上記のようなTAK1の機能 (特にNF- $\kappa$ Bの活性化経路における機能) に着目し、被験物質の作用 (特に阻害又は抑制作用) を検定する。このような機能としては、より具体的には、例えば (1) TAK1とTAB1との相互作用 (結合)、

(2) TAK1のプロテインキナーゼ活性、(3)細胞内のTAK1によるIKK複合体の活性化、(4)細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化、などが挙げられる。これら機能に対する被験物質の作用を検定する方法を以下に述べる。

【0022】(1) TAK1とTAB1との相互作用(結合)に対する作用の検定

例えば、TAK1とTAB1との結合を直接検出する方法、共免疫沈降法(co-immunoprecipitation)法により検出する方法、あるいは、ツーハイブリッドシステム

(two-hybrid system) (米国特許第5283173、およびProc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻、第9578-9582頁、1991年)などの方法を用いることができる。

【0023】TAK1とTAB1との結合を検出する際には、TAK1及びTAB1としてはそれらの全体を用いてもよいが、少なくとも両者の結合に関与する領域を含む部分ポリペプチドを用いてもよい。あるいは、それらに適当なタグ標識(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、6×His、プロテインA、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトースバインディングプロテイン、フラッグ抗原、Xpress抗原、HA抗原、Myc抗原などの部分ポリペプチドなど)を付加した融合タンパク質を用いてもよい。

【0024】TAK1とTAB1との結合を直接検出する場合は、例えばRIなどで標識したTAK1(もしくはTAB1)を用い、TAB1(もしくはTAK1)に必要な応じて適当なタグ標識を付加した融合タンパク質との結合を、被験物質の存在下で直接的に検出する。

【0025】共免疫沈降法(co-immunoprecipitation)法による場合は、例えば、TAK1、TAB1、もしくはこれらに付加したタグ標識を認識する抗体を検出に用いる。まず、TAK1及びTAB1を発現している細胞から細胞溶解液を調製し、一方の蛋白質を認識する抗体を用いて細胞溶解液中のその蛋白質を免疫沈降させる。免疫沈降させた画分に含まれるもう一方の蛋白質の存在を、免疫ブロッティング等の方法により検出することにより、細胞内での両蛋白質の相互作用(結合)を検出できる。

【0026】また、ツーハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとする方法である(米国特許第5283173、およびProc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻、第9578-9582頁、1991年)。

【0027】ツーハイブリッドシステムを利用する場合、具体的には例えば、(i)転写因子の第一領域(DNA結合領域又は転写活性化領域)とTAK1からなる第一の融合蛋白質をコードする遺伝子、(ii)転写因子の第二領域(転写活性化領域又はDNA結合領域)とTAB1からなる第二の融合蛋白質をコードする遺伝子、及び(iii)転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列およびその下流に連結されたレポーター遺

伝子、を含む試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させてインキュベートし、レポーター遺伝子の発現を指標として、TAK1とTAB1の結合に対する被験物質の作用を検定する。被験物質がTAK1とTAB1の結合を阻害する場合には、被験物質の存在によってレポーター活性の減少が認められる。

【0028】第一及び第二の融合蛋白質をコードする遺伝子は通常の遺伝子組換え技術を用いて、設計し構築することができる。

【0029】宿主細胞は、例えば、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞などが挙げられる。これらのうち、酵母細胞は培養が容易で迅速に実施できる上、外来遺伝子の導入など遺伝子組換え技術を適用するのが容易である点で有利である。

【0030】転写因子は、宿主細胞内で機能するものであればよく、例えば、酵母のGAL4蛋白質(Keeganら、Science、第231巻、第699-704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847-853頁、1987年)、GCN4蛋白質(Hopeら、Cell、第46巻、第885-894頁、1986年)、ADR1蛋白質(Thukralら、Molecular and Cellular Biology、第9巻、第2360-2369頁、1989年)などが挙げられる。

【0031】応答配列は、転写因子に対応した応答配列を用いればよく、例えば、転写因子としてGAL4を用いる場合、応答配列としては、UASg(ガラクトース代謝遺伝子の上流域活性化部位:upstream activation site of galactose genes)と称されるGAL4特異的なDNA配列を用いることができる。

【0032】レポーター遺伝子も、特に限定されない。例えば、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT)、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子(Luc)等、安定でかつ活性の定量的測定が容易な酵素の遺伝子などを好適に用いることができる。

【0033】(2) TAK1のプロテインキナーゼ活性に対する作用の検定

例えば、基質蛋白質を含む溶液に、TAK1及びTAB1を含む溶液、及び、ATP(必要に応じてRIなどで標識したもの)を含む溶液を添加し、被験物質の存在下もしくは非存在下で酵素反応を行い、基質蛋白質へのリン酸の取込みなどを指標としてプロテインキナーゼ活性を測定し、被験物質の作用を検定する。

【0034】TAK1及びTAB1は、遺伝子組換え技術により適当な宿主細胞(酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞など)で発現させたもの等を用いることができる。また、TAK1のN末端領域がTAB1との結合に関与しており、N末端(N末端側22アミノ酸)が欠失したTAK1は、TAB1と結合しない場合にも活性型のシグナル伝達分子として作用することが知られている

(Yamaguchiら、Shibuyaら) ので、TAK1とTAB1の両者を用いる代わりに、N末端が欠失したTAB1非依存的に活性を示す活性変異型TAK1を用いてもよい。

【0035】基質蛋白質としては、TAK1自体、TAB1、もしくはそれらの部分ペプチドを用いることができる。また、IKK及びIKK複合体と機能的に相互作用する分子又はそれらの部分ペプチドもまた基質蛋白質として用いることができる。

【0036】この他、アフリカツメガエルのXMEK2 (SEK1) (Shibuyaら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年)、ヒトMKK3 (Derijardら、Science、第267巻、第682～685頁、1995年)、ヒトMKK6 (MAPKK6) (Raingeaudら、Molecular and Cellular Biology、第16巻、第1247～1255頁、1996年； Moriguchiら、Journal of Biological Chemistry、第271巻、第13675～13679頁、1996年)などのMAPKK (mitogen activated protein kinase kinase) やそれらの部分ペプチドを基質として用いることもできる。基質としてMAPKKを用いる場合には、MAPKKの活性化 (MAPK (mitogen activated protein kinase) に対するリン酸化活性の増大) を指標としてTAK1のプロテインキナーゼ活性を測定することもできる。

【0037】(3) 細胞内のTAK1によるIKK複合体活性化に対する作用の検定

例えば、TAK1 (より詳細には活性型のTAK1) を発現増強 (over expression) させた細胞を試験用細胞として用いる。このような試験用細胞としては、TAK1及びTAB1を共に発現増強した細胞が挙げられ、TAK1及びTAB1の発現用ベクターを適当な宿主細胞中に導入することにより得られる。或いは、N末端が欠失したTAB1非依存的に活性を示す活性変異型TAK1を発現増強させた細胞を用いてもよい。

【0038】前記試験用細胞を、例えば、被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細胞から、IKK複合体を含む画分を免疫沈降などにより取得し、これを用いてIKKキナーゼ反応を行い、IKK複合体の活性化を測定して、被験物質の作用を検定する。

【0039】(4) 細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化に対する作用の検定

例えば、前記(3)と同様、活性型TAK1の発現増強細胞を試験用細胞として用い、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。NF- $\kappa$ B活性化をゲルシフトアッセイなどにより検出して、被験物質の作用を検定する。

【0040】活性型TAK1の発現増強細胞は、コントロール細胞 (ベクターのみを導入した細胞など) と比較するとシグナル伝達分子として働くTAK1の発現量が増加している。従って、TAK1に作用する被験薬物を選択したい場合の試験細胞として好適である。例えば、活性型TAK1を発現増強させた細胞及びコントロール

細胞の両者において、被験物質の存在によりNF- $\kappa$ B活性化抑制作用が認められた場合には、該被験物質の作用点はTAK1にある可能性が高いと判断される。

【0041】前記(1)～(4)の方法において、試験に用いる細胞としては、ヒトなどの哺乳動物由来の細胞株を好適に使用でき、例えば、ヒトHeLa細胞、ヒトJurkat細胞、ヒトTHP-1細胞、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞などが挙げられ、このうち、ヒトHeLa細胞、ヒトJurkat細胞、ヒトTHP-1細胞等が好ましい。

【0042】前記(1)～(4)の方法において、TAK1、TAB1、もしくはこれらの融合蛋白質などを発現増強させる場合、既知の配列情報と通常の遺伝子組換え技術を用いて行うことができる。

【0043】TAK1の配列情報は、前記の通りであり、TAB1のcDNA配列およびアミノ酸配列もまた報告されている (Genbank/EMBL データベース Accession No.U49928；Shibuyaら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年)。TAB1は、いずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、モルモットなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。

【0044】TAK1、TAB1などのcDNAあるいは遺伝子は、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用い、通常のPCR (Polymerase Chain Reaction) 法やRT-PCR法、あるいはDNAライブラリからのスクリーニングにより単離することができる。これらを適当なベクターに組み込んで発現用ベクターを構築できる。

【0045】ベクターとしては、適当なプロモーター (例えば、CMVプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 $\alpha$ プロモーター等) を含む動物細胞用のベクター (例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等) を使用できる。

【0046】前記(1)～(4)のような検定方法により、TAK1の機能に対する阻害作用や抑制作用が認められた被験物質については、さらにNF- $\kappa$ B活性化に対する抑制作用を確認すればよい。あるいは、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の既知の病態モデル (in vitro又はin vivo) において治療及び/又は予防効果を確認すればよい。

【0047】NF- $\kappa$ B活性化は、既知のゲルシフトアッセイ法 (Sakuraiら、Journal of Neurochemistry 第59巻、第2067～2075頁、1992年； Sakuraiら、Biochimica Biophysica Acta、第1316巻、第132～138頁、1996年)、レポーターアッセイ法 (Tanakaら、Journal of V

eterinary Medical Science、第59巻、第575-579頁、1997年；EP-652290-A；特開平7-291859；特開平9-227561）等により調べることができる。

【0048】自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の既知の病態モデル（in vitro又はin vivo）としては、ヒトT細胞株（Jurkat細胞）を用いるPHA誘発IL-2産生モデル（Wacholtzら、Cell Immunology、第135巻、第285-298頁、1991年）、ヒトマクロファージ系細胞RAW264.7を用いるLPS+IFN-γ誘発iNOS産生モデル（Xieら、Science、第256巻、第225-228頁、1992年）及びヒトHeLa細胞を用いるTNF-α誘発IL-6産生モデル等のin vitroモデル、ラットアジュバント関節炎モデル（Connorら、European Journal of Pharmacology、第273巻、第15-24頁、1995年）、トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデル（Kissら、European Journal of Pharmacology、第336巻、第219-224頁、1997年）及びラット馬杉腎炎モデル（Sakuraiら、Biochimica Biophysica Acta、第1316巻、第132-138頁、1996年）等のin vivoモデルなどが挙げられる。

【0049】以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0050】なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Molecular Cloning）」（Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊）に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0051】

【実施例】実施例1 ヒトTAK1及びTAB1のcDNA単離

(1) ヒトTAK1のcDNA単離  
ヒト子宮けい癌由来細胞株HeLa（ATCC CCL2）からポリ（A）RNAを調製した。これを鋳型とし、オリゴdTプライマーを用いて一本鎖cDNAを調製した。

【0052】前記で得られた一本鎖cDNAを鋳型とし、PCR（polymerase chain reaction）法により、ヒトTAK1のcDNA断片を取得した。PCRに用いるプライマーは、マウスTAK1のcDNA配列（Genbank/EMBL データベース Accession No. D76446；Yamaguchiら、Science、第270巻、第2008-2011頁、1995年）を参考にして設計し、DNA合成機で合成した。センスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びマウスTAK1 cDNAの翻訳開始コドンとその下流の配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号1）を

用い、アンチセンスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びマウスTAK1 cDNAの終止コドンとその上流の相補配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号2）を用いた。

【0053】前記PCRで得られた産物（約1.7 kbのcDNA断片の混合物）をプローブとし、ヒト肺cDNAライブラリー（Clontech社製）をスクリーニングすることにより、2種のヒトTAK1の全コーディング領域を含むcDNA（hTAK1a-cDNA及びhTAK1b-cDNA）を取得した。

【0054】また、前記と同様にして調製したHeLaのmRNAを鋳型とし、RT-PCR（Reverse transcript - polymerase chain reaction）法により、別途、ヒトTAK1の全コーディング領域を含むcDNA（hTAK1c-cDNA）を得た。プライマーとしては、前記と同様の合成プライマーを用いた。

【0055】得られた3種のcDNAについて、ダイデオキシ法により、そのDNA配列を決定した。各cDNA（hTAK1a-cDNA、hTAK1b-cDNA及びhTAK1c-cDNA）について、そのコーディング領域を含む領域のDNA配列およびそれらにコードされるヒトTAK1（hTAK1a、hTAK1b及びhTAK1c）のアミノ酸配列を、後記配列表の配列番号3、配列番号4、及び配列番号5に示した。

【0056】hTAK1a、hTAK1b及びhTAK1cのcDNA配列は、マウスTAK1のcDNA配列と比較すると、コーディング領域における相同性は、各々91.7%、87.6%及び86.8%であった。

【0057】hTAK1aは、579アミノ酸残基からなる。マウスTAK1と比較すると4アミノ酸の置換が見られ、アミノ酸配列における相同性は99.3%であった。

【0058】hTAK1bは、606アミノ酸残基からなり、hTAK1aと比較するとC末端側にスプライシング変異によって生じたと思われる27アミノ酸の挿入が見られる。また、hTAK1cは、567アミノ酸残基からなり、hTAK1aと比較すると、hTAK1bと同様C末端に27アミノ酸の挿入があり、さらにその下流（C末端側）に39アミノ酸の欠失が見られた。

【0059】3種のヒトTAK1およびマウスTAK1のアミノ酸配列の比較を、図1に示した。

【0060】なお、特開平9-163990の配列番号5に記載されたヒトT細胞株Jurkat由来のTAK1は、hTAK1aのアミノ酸配列と比較すると、1アミノ酸の置換（第372番目のArg→His）が見られ、アレル変異体と考えられる。

【0061】(2) ヒトTAB1のcDNA単離

前項(1)と同様にしてHeLaから調製したポリ

(A) RNAを鋳型とし、RT-PCRによりヒトTA

B1のcDNAを得た。プライマーは、報告されているヒトTAB1のcDNA配列 (Genbank/EMBL データベース Accession No.U49928; Shibuyaら、Science、第272巻、第1179~1182頁、1996年) を参考にして設計し、DNA合成機で合成した。センスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列 (10塩基) 及びTAB1cDNAの翻訳開始コドンとその下流の配列 (20塩基) からなる30マーの合成プライマー (後記配列表の配列番号6) を用い、アンチセンスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列 (10塩基) 及びTAB1cDNAの終止コドンとその上流の相補配列 (20塩基) からなる30マーの合成プライマー (後記配列表の配列番号7) を用いた。

【0062】得られたcDNA断片についてDNA配列を決定し、既知のヒトTAB1の全コーディング領域を含んでいることを確認した。

【0063】実施例2 TAK1の発現を増強させた細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の検出

(1) ヒトTAK1の発現を増強させた細胞の取得  
前記実施例1の(1)において取得した3種のヒトTAK1cDNAを用い、そのコーディング領域を含む部分断片 (hTAK1a-cDNAのEcoRI-NheI断片、hTAK1b-cDNAのEcoRI-NheI断片及びhTAK1c-cDNAのEcoRI-XbaI断片) の各々を、真核細胞発現用ベクタープラスミドp cDNA3.1 (+) (Invitrogen社製) のEcoRI-XbaI切断部位に組込んで、TAK1発現用組換えプラスミドを作製した。

【0064】また、前記実施例1の(2)にて取得したヒトTAB1cDNAを用い、そのコーディング領域を含む部分断片 (HindIII-EcoRI断片) を、発現用ベクタープラスミドp cDNA3.1 (+) のHindIII-EcoRI切断部位に組込んで、TAB1発現用組換えプラスミドを作製した。

【0065】前記TAK1発現用組換えプラスミドを、TAB1発現用組換えプラスミドと共に、もしくは単独で、HeLa細胞にトランスフェクション (一過性トランスフェクション; transient transfection) した。この時、トランスフェクションは、トランスフェクション用カチオン性リボソーム (商品名: LipofectAMINE、Life Technologies社製) を用いて行った。

【0066】かくしてTAK1発現増強細胞もしくはTAK1-TAB1共発現増強細胞を得た。これら細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、ペニシリン (100単位/ml) 及びストレプトマイシン (100 $\mu$ g/ml) を添加した高グルコース含有ダルベッコイーグル培地 (Gibco社製) 中に行なった。

【0067】(2) ゲルシフトアッセイ

前項(1)で得られたTAK1発現増強細胞およびTAK1-TAB1共発現増強細胞を用い、文献 (Sakuraiら、Journal of Neurochemistry 第59巻、第2067~2075

頁、1992年; Sakuraiら、Biochim. Biophys. Acta、第1316巻、第132~138頁、1996年) 記載の方法に準じて、以下のようにゲルシフトアッセイを行った。すなわち、トランスフェクションの後、細胞を培養し24時間後に細胞から核抽出液を調製した。

【0068】この核抽出液 (5 $\mu$ g) とRI標識した検出用プローブとを結合緩衝液 (20mMHEPES (pH7.9), 0.3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 80mM NaCl, 10% グリセロール, 2 $\mu$ g/ml poly[dI-dC]) 中、室温で30分間結合反応させた後、反応液についてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルを減圧乾燥させた後、オートラジオグラフィにてプローブと結合したNF- $\kappa$ Bを検出した。また、コントロールとしては、構成的に発現している転写因子であるOct-1 (Octamer-1) (Verrijzerら、Genes and Development、第4巻、第1964-1974頁、1990年) を検出した。

【0069】検出用プローブは、<sup>32</sup>Pで標識した二本鎖の合成DNAを用いた。NF- $\kappa$ B検出用プローブの配列としては、HIVのLTR (Long Terminal Repeat) に存在するNF- $\kappa$ B結合配列と同様のものを用いた。また、Oct-1検出用プローブの配列としては、コンセンサス配列AGCTAAATを含むオリゴヌクレオチドを用いた。

【0070】前記のようにして、ゲルシフトアッセイによりNF- $\kappa$ Bの核移行を指標としてNF- $\kappa$ B活性化を調べた結果、図2に示した通り、ヒトTAK1 (hTAK1a、hTAK1b又はhTAK1c) をTAB1とともに発現増強させた場合には、NF- $\kappa$ Bの核への移行が見られ、NF- $\kappa$ Bの活性化が認められた。このような結果は、ヒトTAK1として、hTAK1a、hTAK1b及びhTAK1cのいずれを用いた場合にも認められたが、特にhTAK1bにおいて、NF- $\kappa$ Bの活性化が顕著であった。

【0071】一方、ヒトTAK1のみを発現増強させた細胞においては、NF- $\kappa$ Bの活性化が認められなかった。また、コントロール蛋白質として検出したOct-1は、TAK1及び/又はTAB1の発現増強には影響を受けず、恒常的に発現が見られた。

【0072】このように、ヒトTAK1の作用の増強に伴って、NF- $\kappa$ Bの活性化が観察されたことから、TAK1は、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るまでのシグナル伝達経路において、伝達分子として主要な働きをしていることがわかった。

【0073】(3) レポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ)

田中らの文献 (Tanakaら、Journal of Veterinary Medical Science、第59巻、第575-579頁、1997年) 記載の方法に準じ、以下のようにしてレポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ) を行った。

【0074】まず、NF- $\kappa$ B 結合配列 (GGGGACTTTC

10

20

30

40

50

C)を4個連結したオリゴヌクレオチドを ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の上流に組み込んで、レポータープラスミド (p(kB)4-Luc) を作製した。

【0075】次に、前項(1)記載の方法に準じ、TAK1発現用組換えプラスミドを、必要に応じてTAB1発現用組換えプラスミドと共に、HeLa細胞にトランスフェクション(一過性トランスフェクション; transient transfection)した。但、トランスフェクションに際しては、前記で得られたレポータープラスミド (p(kB)4-Luc) を共に用いた。

【0076】かくしてレポータープラスミド及びTAK1発現用組換えプラスミド(及びTAB1発現用組換えプラスミド)を含むトランスフェクタントを得た。得られたトランスフェクタントを48時間培養した後、細胞を溶解して調製した抽出液について、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼアッセイキット、ピッカジーン(商品名、東洋インキ社製)及び化学発光測定装置(MicroLumant LB96P、ベルトールドジャパン株式会社製)を用いて測定した。

【0077】その結果、図3に示した通り、ヒトTAK1(hTAK1a、hTAK1b又はhTAK1c)のみを発現増強させた細胞においては、ベクターのみを含む細胞と比較してルシフェラーゼ活性の増加(すなわち、NF- $\kappa$ Bの活性化)はほとんど認められなかった。しかし、ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞では、ベクターのみを含む細胞と比較して、ルシフェラーゼ活性の顕著な増加(すなわち、NF- $\kappa$ Bの活性化)が認められた。

【0078】このように、前記のゲルシフトアッセイ法と同様、レポーターアッセイ法(ルシフェラーゼアッセイ法)によっても、ヒトTAK1の作用の増強に伴って、NF- $\kappa$ Bの活性化が観察され、TAK1が伝達分子として主要な働きをしていることが確認された。

【0079】また、このようにTAK1発現増強細胞とコントロール細胞を用いるレポーターアッセイの系により、被験薬物のTAK1に対する作用とNF- $\kappa$ B活性化に対する作用を同時に検定することができると考えられる。

【0080】実施例3 ツーハイブリッドシステムを利用したTAK1とTAB1との結合検出系

前記実施例1の(1)で得たヒトTAK1cDNAの翻訳領域を切り出し、これを、転写因子GAL4のDNA結合領域(GAL4の1から147番目のアミノ酸残基)をコードするDNAを含む発現ベクターpGBT9(Clontech社製、酵母two-hybridシステム用ベクター)のマルチクロニング部位に挿入する。これにより、GAL4のDNA結合領域とヒトTAK1との融合タンパク質を発現するためのプラスミドpGBT9-TAK1を得る。

【0081】前記実施例1の(2)で得たヒトTAB1cDNAの翻訳領域を切り出し、これを、GAL4の転写活性

化領域(GAL4の768から881番目のアミノ酸残基)をコードするDNAを含む発現ベクターpGAD424(Clontech社製、酵母two-hybridシステム用ベクター)のマルチクロニング部位に挿入する。これにより、GAL4の転写活性化部位とTAB1との融合蛋白質を発現するためのプラスミドpGAD424-TAB1を得る。

【0082】前記で得られる融合蛋白質発現プラスミドpGBT9-TAK1及びpGAD424-TAB1を宿主酵母細胞株SFY526

(Clontech社製)に導入する。細胞株SFY526は、GAL1とlacZの融合遺伝子が染色体に組み込まれており、GAL4遺伝子の欠損変異を有している細胞株である(Bartelら、Bio Techniques、第14巻、第920-924頁、1993年)。形質転換は、それぞれのプラスミドの選択マーカーであるトリプトファン及びロイシンを欠乏させた合成培地にて培養することにより選別を行って、両プラスミドが導入された形質転換株を得る。

【0083】前記で得られる酵母形質転換株を、液体培地で培養する。培養の際、培地中には、被験物質を添加(もしくは無添加)する。4~5時間培養後、酵母菌体を遠心分離により回収し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として、TAK1とTAB1の結合(相互作用)を検出する。

【0084】被験物質の添加によって、濃度依存的に $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の減少が認められた場合には、その被験物質には、TAK1とTAB1の結合を阻害する作用を有すると考えられる。

【0085】実施例4 TAK1のMAPKKK活性の検出系

ヒトTAK1(又はN末端(22アミノ酸)が欠失したヒトTAK1)を、以下のようにして昆虫細胞の系で発現させ精製する。すなわち、前記実施例1の(1)で得たヒトTAK1cDNAの翻訳領域を用い、タグペプチド(6×His又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ)を付加するために設計した適切なDNA配列を含むバキュロウイルス発現ベクターpAcHLT又はpAcGHLT(ファーマンジェン社製)のマルチクロニング部位に挿入し、ヒトTAK1発現プラスミドを得る。得られたプラスミドを宿主昆虫細胞SF21に導入し得られた形質転換細胞を培養して、タグペプチドが付加されたヒトTAK1(又はN末端欠失ヒトTAK1)を発現させ、細胞抽出液から、付加したタグペプチドを利用するアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

【0086】また、前記と同様にして、ヒトTAB1を昆虫細胞の系で発現させ精製する。

【0087】また、ヒトMKK3及びヒトMKK6を、以下のようにして発現させ精製する。まず、モリグチ(Moriguchi)らの方法(Journal of Biological Chemistry、第271巻、第13675~13679頁、1996年)に準じ、ヒトMKK3に関する配列情報(Genbank/EMBL データ



ベース Accession No.L36719; Derijardら、Science、第267巻、第682～685頁、1995年) 及びヒトMKK6に関する配列情報 (Genbank/EMBL データベース Accession No.U39656およびU39657; Raingeaudら、Molecular and Cellular Biology、第16巻、第1247～1255頁、1996年) をもとにプライマーを設計し、これらを用いるPCR法により、ヒトMKK3及びヒトMKK6の全翻訳領域を含むcDNA、又はTAK1によってリン酸化されるアミノ酸残基近傍の配列を含むcDNAを取得する。これらcDNAを用い、タグペプチド(6×His又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ)を付加するために設計した適切なDNA配列を含む大腸菌発現ベクターpQE-30(QIAGEN社製)又はpGEX-2T(ファルマシア社製)のマルチクローニング部位に挿入して、ヒトMKK3発現プラスミド及びヒトMKK6発現プラスミドを得る。得られるプラスミドを宿主大腸菌(JM109株など)に導入し得られた形質転換細胞を培養して、タグペプチドが付加されたヒトMKK3及びヒトMKK6を各々発現させ、細胞抽出液から、付加したタグペプチドを利用するアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

【0088】前記で得られるヒトTAK1(又はN末端欠失ヒトTAK1)を必要に応じてヒトTAB1と組み合わせ酵素(MAPKKK)として用い、ヒトMKK3もしくはヒトMKK6を基質として用いて、被験物質の存在下又は非存在下で酵素反応を行う。基質蛋白質は予めプレート上に固相化して用い、反応は<sup>32</sup>P又は<sup>33</sup>P標識ATP100μMを含むトリス緩衝液(20mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EGTA, 10mM MgCl<sub>2</sub>)中30℃にて行う。酵素反応後、プレートを洗浄した後シンチレーションカウンターにて<sup>32</sup>P又は<sup>33</sup>P標識ATPの取込みを測定してすることにより、酵素活性を測定し、被験物質による阻害の有無を判定する。

【0089】実施例5 変異型TAK1を発現させた細胞におけるNF-κB活性化の抑制  
以下のようにして、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1(または野生型TAK1)を発現増強させた細胞を用い、NF-κB活性化の有無を検出した。

【0090】(1) TAK1及びTAB1の発現ベクター構築とトランスフェクション  
ベクタープラスミドpFLAG-CMV2は、フラッグ抗原のタグを付加した蛋白質を哺乳動物細胞中で発現させるためのベクターである。ヒトTAK1(ヒトTAK1a)の全長cDNAを、pFLAG-CMV2(Kodak社製)のEcoRI-XbaI制限酵素切断部位に組み込むことにより、フラッグ付加された野生型TAK1(Flag-TAK1)の発現ベクターを得た。

【0091】また、変異導入用キット(QuickChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene社製)を用い、前記Flag-TAK1発現ベクターのTAK1翻

訳領域に変異導入して各種変異発現ベクターを取得し、塩基配列を決定した。かくしてフラッグ付加された変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の発現ベクターを得た。この発現ベクターにより発現される変異型TAK1は、野生型TAK1の63番目のリジン残基がトリプトファン残基に置換されており、TAK1のキナーゼ活性を失っていた。

【0092】前記のフラッグ付加された野生型又は変異型TAK1(Flag-TAK1又はFlag-TAK1K63W)の発現ベクターを、単独あるいはTAB1発現ベクターとともにHeLa細胞にトランスフェクションし、一過性に発現させた。また、コントロールとして、TAK1発現ベクターにかえてベクターのみを用いた。トランスフェクションは、リポフェクトアミン試薬(Life Technologies社製)を用いて行い、TAB1の発現ベクターは前記実施例2(1)と同じものを用いた。

【0093】(2) ゲルシフトアッセイ

前記(1)で得た、フラッグ付加された変異型TAK1(又は野生型TAK1)をTAB1とともに発現増強させた細胞を用い、実施例2(2)と同様にして、ゲルシフトアッセイを行った。

【0094】その結果、図4の(A)に示した通り、ベクターのみ導入した細胞と比較して、野生型TAK1(Flag-TAK1)をTAB1とともに発現増強させた細胞において、NF-κBの核移行が増強され、NF-κB活性化が認められた。しかし、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の場合は、TAB1とともに発現させてもNF-κBの核移行は増強されなかった。

【0095】(3) レポーターアッセイ(ルシフェラーゼアッセイ)

前記(1)で得た、変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクションした。但、トランスフェクションに用いるFlag-TAK1K63W発現ベクターの量は、0μg、0.03μg及び0.1μgの3種類とし、トータルのDNA量が同じ(0.1μg)になるようベクタープラスミドで調整した。

【0096】また、トランスフェクションの際には、実施例2の(3)で得たレポータープラスミド(NF-κB結合配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むp(kB)4-Luc)を同時に加えてトランスフェクションした。

【0097】トランスフェクションの24時間後、培地中にTNF-αを最終濃度20ng/mlとなるよう添加した(コントロールはTNF-α無添加とした)。さらに、5時間培養後、実施例2の(3)と同様にして、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0098】その結果を、図4(B)に示した(図中T

AK1K63Wの無印、+、++は、各々Flag-TAK1K63W発現ベクターの添加量0 $\mu$ g、0.03 $\mu$ g及び0.1 $\mu$ gを各々表す。図4(B)に示した通り、TNF- $\alpha$ 刺激によって誘導されたルシフェラーゼ活性の増加(NF- $\kappa$ Bの活性化)は、トランスフェクトに用いた変異型TAK1発現ベクターの用量に依存して抑制された。

【0099】この結果から、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1は、細胞内で発現させることにより、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することがわかった。

【0100】このことは、前記(2)の結果と同様、NF- $\kappa$ B活性化経路においてTAK1が主要な働きをする分子であることを裏付けるとともに、TAK1のキナーゼ活性やTAK1の活性化を阻害する薬物が、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することを強く裏付けるものである。

【0101】実施例6 細胞内におけるTAK1とTAB1の相互作用

以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞を用い、免疫沈降法により細胞内におけるTAK1とTAB1の相互作用(結合)を検出した。

【0102】(1)細胞のトランスフェクション  
まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1(Flag-TAK1)又は変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。

【0103】(2)免疫沈降および免疫ブロッティング  
トランスフェクションの24時間後、細胞を回収し、以下のようにして細胞溶解液(cell lysate)を調製した。すなわち、細胞を、細胞溶解緩衝液(25mM HEPES(pH7.7)、0.3M NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM EDTA、0.1% Triton X-100、20mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1mM sodium orthovanadate、0.5mM PMSF、1mM DTT、10 $\mu$ g/ml aprotinin、10 $\mu$ g/ml leupeptin)を用いて溶解した後、3倍に希釈し、10分間水冷した。遠心後、上清を分取し、これを細胞溶解液として以下の操作に用いた。

【0104】前記で得た細胞溶解液を、抗フラッグ抗体(M5、コダック社製)とともに1.5時間水冷インキュベートし、さらにプロテインGセファロース(Pharmacia社製)を添加し、4 $^{\circ}$ C、1.5時間緩やかに混合して、免疫複合体をプロテインGセファロースビーズに吸着させた。このビーズを遠心により回収した後、洗浄用緩衝液(20mM HEPES(pH7.7)、50mM NaCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EDTA、0.05% Triton X-100)で5回洗浄し、これを免疫沈降画分として以下の操作に用いた。

【0105】前記ビーズ(免疫沈降画分)をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、PVDF(polyvinylidene difluoride)膜に転写し、免疫ブロッティングを行って、免疫沈降画分中に存在するTAB

1及びTAK1を検出した。TAK1及びTAB1を検出するための抗体としては、抗TAK1抗体(M-17)(Santa Cruz Biothecnology社製)及び抗-TAB1抗体(N-19)(Santa Cruz Biothecnology社製)を各々用いた。

【0106】抗フラッグ免疫沈降画分の免疫ブロッティングの結果を図5に示した。上段は、抗TAB1抗体での検出結果、また下段は抗TAK1抗体での検出結果である。

【0107】図5に示した通り、野生型TAK1(Flag-TAK1)を発現増強させた細胞の抗フラッグ免疫沈降画分中に、TAB1が共存していた。また、野生型にかえて変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)を発現増強させた細胞においても同様に、免疫沈降画分中にTAB1が共存していた。

【0108】このように、TAB1はTAK1(野生型及び変異型)と共免疫沈降されたことから、TAK1とTAB1は細胞内で相互作用していることがわかる。

【0109】また、野生型TAK1とTAB1は、共発現させた場合に両者ともSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度がやや減少する傾向が見られたが、キナーゼ活性を有しない変異型TAK1の場合にはこのような移動度の減少は見られなかった。このような移動度の減少は、両蛋白質が、機能的な相互作用によりリン酸化を受けたことを反映していると考えられた。

【0110】(3)被験物質の作用の検定

前記(1)と同様にして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞を得、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細胞について、前記

(2)と同様にして免疫沈降法によりTAK1とTAB1の相互作用(結合)を検出する。被験物質の存在によって、TAK1とTAB1の共免疫沈降が減少するかどうかを判定することにより、その被験物質のTAK1とTAB1の相互作用(結合)に対する被験物質の作用を検定する。

【0111】実施例7 TAK1による自己リン酸化とTAB1リン酸化

以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞から免疫沈降させたTAK1について、キナーゼアッセイを実施し、TAK1による自己リン酸化とTAB1のリン酸化を検出した。

【0112】(1)細胞のトランスフェクション及び免疫沈降

まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1(Flag-TAK1)又は変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後の細胞から、実施例6と同様にして細胞溶解液を調製し、抗フラッグ抗体による免疫沈降を行った。

## 【0113】(2) キナーゼアッセイ

前記で得た抗フラッグ免疫沈降画分を用い、以下のよう  
にして、インビトロのキナーゼ反応を行った。

【0114】すなわち、免疫沈降画分を、30 $\mu$ lのキ  
ナーゼ緩衝液(20mM HEPES(pH7.6)、20mM MgCl<sub>2</sub>、2mM D  
TT、20 $\mu$ MATP、20mM  $\beta$ -glycerophosphate、20mM diso  
dium p-nitrophenylphosphate、0.1mM sodium orthovan  
adate、3 $\mu$ Ci[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP)に加え、30℃、30分間  
インキュベートした。反応終了後、反応液をSDS-ポ  
リアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルに  
ついてオートラジオグラフィーを実施した。

【0115】その結果、図6に示した通り、野生型TA  
K1(Flag-TAK1)とTAB1の両者を発現増  
強させた細胞の抗フラッグ免疫沈降画分では、TAK1  
のリン酸化(自己リン酸化)及びTAB1のリン酸化が  
認められた。しかし、野生型TAK1のみを発現増強さ  
せた細胞の免疫沈降画分では、TAK1及びTAB1の  
いずれのリン酸化も認められなかった。また、キナーゼ  
活性を欠く変異型TAK1については、TAB1と共に  
発現増強させた場合でもリン酸化は認められなかった。

【0116】これらのことから、TAK1はTAB1と  
共存することにより活性化されて、TAK1の自己リン  
酸化及びTAK1によるTAB1のリン酸化が起こると  
考えられた。

【0117】実施例8 細胞内におけるTAK1とIKK  
との相互作用

以下のようにして、TAK1をIKKとともに発現増強  
させた細胞を用い、免疫沈降法により細胞内におけるT  
AK1とIKKとの相互作用(結合)を検出した。

## 【0118】(1) 細胞のトランスフェクション

まず、ヒトIKK $\alpha$ およびヒトIKK $\beta$ の各cDNA  
を、ベクタープラスミドpcDNA3.1(+His  
B(Invitrogen社製)に組込むことによりI  
KKの発現ベクターを取得した。ヒトIKK $\alpha$ (Genban  
k/EMBL accessionNo.AF012890; Cell、第90巻、第373-  
383頁、1997年)、およびヒトIKK $\beta$ (Genbank/EMBL  
accession No.AF029684; Science、第278巻、第866-86  
9頁、1997年)のcDNAは、ヒト単球由来細胞株(T  
HP-1)のmRNAから逆転写PCR(Reverse tran  
scriptase-polymerase chain reaction)により取得し  
たものを用いた。

【0119】これらIKK発現ベクター(IKK $\alpha$ 発現  
ベクター及びIKK $\beta$ 発現ベクター)により、Xpre  
ssタグポリペプチドが付加されたIKK(Xpres  
s-IKK $\alpha$ またはXpress-IKK $\beta$ )を発現さ  
せることができる。

【0120】次に、実施例5と同様にして、フラッグ付  
加した野生型TAK1(Flag-TAK1)の発現ベ  
クターを、単独又はTAB1発現ベクターとともにHe  
La細胞にトランスフェクションした。この際、前記で

得たIKK(Xpress-IKK $\alpha$ またはXpres  
s-IKK $\beta$ )の発現ベクターも同時に添加(又は非添  
加)してトランスフェクションした。

【0121】(2) 免疫沈降及び免疫ブロッティング  
トランスフェクションの24時間後の細胞から、実施例  
6と同様にして、細胞溶解液を調製、抗フラッグ抗体に  
よる免疫沈降を行った。免疫沈降画分及び細胞溶解液に  
ついてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った  
後、免疫ブロッティングを行って、IKK及びTAK1  
を検出した。

【0122】IKK(Xpress-IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )  
及びTAK1を検出するための抗体としては、抗Xpr  
ess抗体(M-21)(Santa Cruz Biothecnology  
社製)及び抗-TAK1抗体(M-17)(Santa Cruz  
Biothecnology社製)を各々用いた。

【0123】抗フラッグ免疫沈降画分の免疫ブロッティ  
ングの結果を図7に示した。

【0124】上段は、抗フラッグ免疫沈降画分の抗Xp  
ress抗体による検出結果、中段は、細胞溶解液の抗  
Xpress抗体による検出結果、また下段は、抗フラ  
ッグ免疫沈降画分の抗TAK1抗体による検出結果であ  
る。

【0125】図7に示した通り、TAK1(Flag-  
TAK1)とIKK(Xpress-IKK $\alpha$ 又はXp  
ress-IKK $\beta$ )を発現増強させTAB1は発現増  
強させなかった細胞では、抗フラッグ免疫沈降画分中に  
IKKが検出された。このようにIKK(IKK $\alpha$ 及び  
 $\beta$ )がTAK1と共免疫沈降されたことから、TAK1  
とIKK(IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )は細胞内で相互作用してい  
ることがわかった。

【0126】しかし、TAK1、IKKとともにTAB  
1も発現増強させた細胞では、抗フラッグ免疫沈降画分  
中にIKKは検出されなかった。このことから、TAK  
1は、活性化されていない状態では細胞内でIKKと安  
定な結合を生じるが、TAB1により活性化された状態  
では、細胞内でのIKKとの結合との安定な結合が見ら  
れないと考えられた。

【0127】また、細胞溶解液の免疫抽出液の免疫プロ  
ットティングの結果、TAK1及びIKKとともにTAB  
1も発現増強させた細胞においては、IKK(IKK $\alpha$   
及び $\beta$ )のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で  
の移動度がやや減少する傾向が認められた。一方、この  
ような傾向は、TAB1を発現増強させなかった細胞に  
おいては見られなかった。

【0128】これらのことから、TAB1で活性化され  
たTAK1の存在によって、IKKの両サブユニット  
(IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )は細胞内でリン酸化を受けるものと  
考えられた。すなわち、TAK1は、NIK(Regnier  
et al., 1997; Woronicz et al., 1997)と同様に、IK  
K(又はIKK複合体と機能的に相互作用する分子)を

リン酸化して、IKKのキナーゼ活性を促進することにより、NF- $\kappa$ B活性化を誘導すると考えられる。

【0129】実施例9 TAK1によるIKK複合体の活性化

以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞から免疫沈降させたIKK複合体について、I $\kappa$ Bを基質とするキナーゼ反応（IKKキナーゼアッセイ）を実施し、IKK複合体の活性化を検出した。

【0130】（1）細胞のトランスフェクション及び免疫沈降

まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1（Flag-TAK1）又は変異型TAK1（Flag-TAK1K63W）の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。

【0131】また、外来性IKKを発現増強させる系では、実施例8と同様に、Xpressタグ付加されたIKK（Xpress-IKK $\alpha$ 又はXpress-IKK $\beta$ ）の発現ベクターも同時に添加してトランスフェクションした。

【0132】トランスフェクションの24時間後の細胞から、実施例6と同様にして、細胞溶解液を調製し、免疫沈降を行った。但、免疫沈降に用いる抗体は、内在性IKK複合体を免疫沈降させるためには抗IKK $\alpha$ 抗体（H-744）（Santa Cruz Biotechnology社製）を用い、また外来性IKKの免疫沈降のためには抗Xpress抗体（M-21）（Santa Cruz Biotechnology社製）を用いた。用いた抗IKK $\alpha$ 抗体は、IKK $\alpha$ と同様IKK $\beta$ も認識する。

【0133】（2）IKKキナーゼアッセイ

前記で得られた免疫沈降画分について、実施例7と同様にして、インビトロのキナーゼ反応を行った。但、基質として、組換えI $\kappa$ B（2.5 $\mu$ g）を反応系に添加した。反応終了後、反応液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルについてオートラジオグラフィーを実施した。

【0134】反応基質とする組換えI $\kappa$ Bとしては、GST-（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）のC末端にヒトI $\kappa$ B $\alpha$ の第1から54番目までのアミノ酸残基からなる部分ポリペプチドを連結した融合ペプチド（以下、GST-I $\kappa$ B $\alpha$ 1-54）を用いた。

【0135】組換えI $\kappa$ Bは、大腸菌宿主にGST-I $\kappa$ B $\alpha$ 1-54の発現ベクターを導入した形質転換株の培養物から調製した。GST-I $\kappa$ B $\alpha$ 1-54の発現ベクターは、ヒトI $\kappa$ B $\alpha$ （Genbank/EMBL accession No. M69043；Cell、第65巻、第1281-1289頁、1991年）のcDNAのうち第1から54番目までのアミノ酸残基をコードするcDNA部分を、ベクタープラスミドpGEX-2T（Pharmacia社製）のBamHI-EcoRI切断部位

に挿入して作製した。

【0136】IKKキナーゼアッセイの結果を図8に示した。（A）は、内在性IKK複合体（抗IKK $\alpha$ 抗体による免疫沈降画分）のキナーゼアッセイの結果であり、（B）は、外来性IKK（抗Xpress抗体による免疫沈降画分）のキナーゼアッセイの結果である。

【0137】図8（A）に示した通り、フラッグ付加した野生型TAK1（Flag-TAK1）およびTAB1と共に発現増強させた場合、内在性IKK複合体のIKKキナーゼ活性は顕著に増加した。一方、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1（Flag-TAK1K63W）はIKK活性を促進しなかった。

【0138】また、外来性IKKを発現させた細胞においても、図8（B）に示した通り、野生型TAK1をTAB1と共に発現増強させた場合、外来性IKK $\alpha$ 及び $\beta$ のIKKキナーゼ活性が増大したが、変異型TAK1ではTAB1と共に発現増強させてもIKKキナーゼ活性は増大しなかった。

【0139】これらの結果は、TAB1により活性化されたTAK1は、IKK $\alpha$ 及びIKK $\beta$ を活性化することによりNF- $\kappa$ Bを活性化することを裏付ける。

【0140】（3）被験物質の作用の検定

前記と同様の系を用い、TAK1によるIKK複合体活性化に対する被験物質の作用を検定することができる。すなわち、TAK1をTAB1とともに発現増強した細胞を得、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細胞について、前記と同様にしてIKK複合体画分を免疫沈降させ、免疫沈降画分のIKKキナーゼ活性を測定して、被験物質の存在によりIKKキナーゼ活性が減少するかどうかを判定する。

【0141】

【発明の効果】本発明の方法は、新しい伝達分子に焦点をあてたNF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法およびスクリーニング方法となる。本発明によれば、TAK1に作用点を有する、新しいタイプのNF- $\kappa$ B活性化抑制薬を得ることができる。また、本発明の方法は、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法及びスクリーニング方法としても有用である。

【0142】本発明の方法により選択された薬物、あるいは同定された薬物は、作用点が明らかとなっているので、医薬品としての開発に有利である。

【0143】また、TAK1の機能を阻害又は抑制する作用を有する薬物は、新しいタイプのNF- $\kappa$ B活性化抑制薬となるほか、自己免疫疾患（慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、ベーチェット病、結節性動脈周囲炎、潰瘍性大腸炎、糸球体腎炎など）、炎症症状を呈する難治性疾患（変形性関節症、アテローム硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎など）、各種ウイルス性疾患、エンドトキシンショック、敗血症など

の疾患の治療薬及び／又は予防薬となる。

【0144】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成プライマー）

配列

GCCCAGATCT ATGTCGACAG CCTCCGCCGC

【0145】配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成プライマー）

配列

GCGCAGATCT TCATGAAGTG CCTTGTCTT

。

10 【0146】

配列番号：3

配列の長さ：2785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GGACACGGCT GTGGCCGCTG CCTCTACCCC CGCCACGGAT CGCCGGGTAG TAGGACTGCG	60
CGGCTCCAGG CTGAGGGTCG GTCCGGAGGC GGGTGGGCGC GGCTCTCACC CGGATTGTCC	120
GGGTGGCACC GTTCCCGGCC CCACCGGGCG CCGCGAGGGA TC	162
ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC	207
Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
1 5 10 15	
GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG	252
Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu	
20 25 30	
ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA	297
Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT	342
Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val	
50 55 60	
GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT	387
Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile	
65 70 75	
GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA	432
Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val	
80 85 90	
AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA	477
Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu	
95 100 105	
TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA	522
Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu	
110 115 120	
CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA	567
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
125 130 135	
CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA	612
Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu His Ser Met Gln Pro Lys	

25

26

140	145	150	
GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT			657
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val			
155	160	165	
GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT			702
Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys			
170	175	180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG			747
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp			
185	190	195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT GAA AAA TGT			792
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys			
200	205	210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACG CGT			837
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg			
215	220	225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG			882
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met			
230	235	240	
TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA			927
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu			
245	250	255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT			972
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp			
260	265	270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT			1017
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr			
275	280	285	
CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT			1062
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr			
290	295	300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT			1107
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser			
305	310	315	
ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA			1152
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys			
320	325	330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT			1197
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile			
335	340	345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG			1242
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln			
350	355	360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT			1287
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser			
365	370	375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT			1332
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala			
380	385	390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GGC AAC			1377

Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Gly Asn	
395 400 405	
GGA CAG CCA AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA	1422
Gly Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly	
410 415 420	
ACA GAA CCT GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC	1467
Thr Glu Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val	
425 430 435	
AGA ATG ATT ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA	1512
Arg Met Ile Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg	
440 445 450	
AGT CAT CCA TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA	1557
Ser His Pro Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser	
455 460 465	
GAT AAC TCC ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA	1602
Asp Asn Ser Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu	
470 475 480	
CAG CCT CTA GCA CCG TGC CCA AAC TCC AAA GAA TCT ATG GCA GTG	1647
Gln Pro Leu Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val	
485 490 495	
TTT GAA CAG CAT TGT AAA ATG GCA CAA GAA TAT ATG AAA GTT CAA	1692
Phe Glu Gln His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln	
500 505 510	
ACA GAA ATT GCA TTG TTA TTA CAG AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA	1737
Thr Glu Ile Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala	
515 520 525	
GAA CTG GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA TCT CGC CTG	1782
Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu	
530 535 540	
GTA CAG GAA CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA AGC CTT TCT	1827
Val Gln Glu His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser	
545 550 555	
ACT TAC TAC CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC ATC AGA AGT	1872
Thr Tyr Tyr Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser	
560 565 570	
CAG CAG CAG AAA CGA CAA GGC ACT TCA	1899
Gln Gln Gln Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
575 579	
TGATTCTCTG GGACCGTTAC ATTTTGAAAT ATGCAAAGAA AGACTTTTTT TTTAAGGAAA	1959
GGAAACCTT ATAATGACGA TTCATGAGTG TTAGCTTTTT GCGTGTCTT GAATGCCAAC	2019
TGCCTATATT TGCTGCATTT TTTTCATTGT TTATTTTCCT TTTCTCATGG TGGACATACA	2079
ATTTTACTGT TTCATTGCAT AACATGGTAG CATCTGTGAC TTGAATGAGC AGCACTTTGC	2139
AACTTCAAAA CAGATGCAGT GAACTGTGCC TGTATATGCA TGCTCATTGT GTGAAGGCTA	2199
GCCTAACAGA ACAGGAGGTA TCAAACTAGC TGCTATGTGC AAACAGCGTC CATTTTTTCA	2259
TATTAGAGGT GGAACCTCAA GAATGACTTT ATTCTTGAT CTCATCTCAA AATATTAATA	2319
ATTTTTTTCC CAAAAGATGG TATATACCAA GTTAAAGACA GCGTATTATA AATTTAGAGT	2379
GATTGCTGGT ATATTACGGA AATACGGAAC CTTAGGGAT AGTCCGTGT AAGGCCTTTG	2439
ATGCCAGCAT CCTTGGATCA GTAAGTGAAGT CACTTCCATC CGTAAATAT GTAAAGGTAA	2499
GTGGCAGCTG CTCTATTTAA TGAAAGCAGT TTTACCGGAT TTTGTTAGAC TAAATTTGA	2559
TTGTGATACA TTGAACAAAA TGGAATCAT TTTTTTTTAA GGAGTAAAGA TTTTAAATTC	2619

29

30

TCTGATTCTG TGTATCTGTG TTGAACTGT AAAGCTTTTA TGACTCTAAT ATTAATCTCT 2679  
 TAAATGAAAT TAAAAGGCAA AAGAACATGA TTGAGCTTAA ATGATCATTT CTTCCTGCAG 2739  
 TGATTCTTGG ATTGTTTCT CATGTATTG AAAAAAAAAA AAAAAA 2785

。

【0147】

配列番号：4

配列の長さ：2866

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GGACACGGCT GTGGCCGCTG CCTCTACCCC CGCCACGGAT CGCCGGGTAG TAGGACTGCG 60  
 CGGCTCCAGG CTGAGGCTCG GTCCGGAGGC GGGTGGGCGC GGGTCTCACC CGGATTGTCC 120  
 GGGTGGCACC GTTCCCGGCC CCACCGGGCC CCGCGAGGGA TC 162  
 ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC 207  
 Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG 252  
 Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu  
 20 25 30  
 ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA 297  
 Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly  
 35 40 45  
 GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TCG AGA GCA AAA GAT GTT 342  
 Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val  
 50 55 60  
 GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT 387  
 Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile  
 65 70 75  
 GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA 432  
 Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val  
 80 85 90  
 AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA 477  
 Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu  
 95 100 105  
 TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA 522  
 Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu  
 110 115 120  
 CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TCG TGT TTA 567  
 Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu  
 125 130 135  
 CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA 612  
 Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu  
 140 145 150  
 GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT 657  
 Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val  
 155 160 165  
 GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT 702  
 Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys



	170	175	180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG				747
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp				
	185	190	195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT GAA AAA TGT				792
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys				
	200	205	210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACC CGT				837
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg				
	215	220	225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG				882
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met				
	230	235	240	
TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTC ATA AAA AAT TTA				927
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu				
	245	250	255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT				972
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp				
	260	265	270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT				1017
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr				
	275	280	285	
CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT				1062
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr				
	290	295	300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT				1107
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser				
	305	310	315	
ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA				1152
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys				
	320	325	330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT				1197
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile				
	335	340	345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG				1242
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln				
	350	355	360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT				1287
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser				
	365	370	375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT				1332
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala				
	380	385	390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GCC TAT				1377
Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Ala Tyr				
	395	400	405	
TCC AAG CCT AAA CGG GGC CAC CGT AAA ACT GCT TCA TTT GGC AAC				1422
Ser Lys Pro Lys Arg Gly His Arg Lys Thr Ala Ser Phe Gly Asn				
	410	415	420	
ATT CTG GAT GTC CCT GAG ATC GTC ATA TCA GGC AAC GGA CAG CCA				1467

Ile Leu Asp Val Pro Glu Ile Val Ile Ser Gly Asn Gly Gln Pro	
425 430 435	
AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA ACA GAA CCT	1512
Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro	
440 445 450	
GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC AGA ATG ATT	1557
Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val Arg Met Ile	
455 460 465	
ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA AGT CAT CCA	1602
Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg Ser His Pro	
470 475 480	
TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA GAT AAC TCC	1647
Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser Asp Asn Ser	
485 490 495	
ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA CAG CCT CTA	1692
Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu Gln Pro Leu	
500 505 510	
GCA CCG TGC CCA AAC TCC AAA GAA TCT ATG GCA GTG TTT GAA CAG	1737
Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val Phe Glu Gln	
515 520 525	
CAT TGT AAA ATG GCA CAA GAA TAT ATG AAA GTT CAA ACA GAA ATT	1782
His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr Glu Ile	
530 535 540	
GCA TTG TTA TTA CAG AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA GAA CTG GAC	1827
Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu Asp	
545 550 555	
CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA TCT CGC CTG GTA CAG GAA	1872
Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu	
560 565 570	
CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA AGC CTT TCT ACT TAC TAC	1917
His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr	
575 580 585	
CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC ATC AGA ACT CAG CAG CAG	1962
Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln	
590 595 600	
AAA CGA CAA GGC ACT TCA	1980
Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
605 606	
TGATTCTCTG GGACCGTTAC ATTTTGAAAT ATGCAAAGAA AGACTTTTTT TTAAAGGAAA	2040
GGAAACCTT ATAATGACGA TTCATGAGTG TTAGCTTTTT GCGTGTCT GAATGCCAAC	2100
TGCCTATATT TGCTGCATTT TTTTCATTGT TTATTTTCCT TTTCTCATGC TGGACATACA	2160
ATTTTACTGT TTCATTGCAT AACATGGTAG CATCTGTGAC TTGAATGAGC AGCACTTTGC	2220
AACTTCAAAA CAGATGCAGT GAACTGTGGC TGTATATGCA TGCTCATTGT GTGAAGGCTA	2280
GCCTAACAGA ACAGGAGGTA TCAAACTAGC TGCTATGTGC AAACAGCGTC CATTTTTTCA	2340
TATTAGAGGT GGAACCTCAA GAATGACTTT ATTCTTGTAT CTCATCTCAA AATATTAATA	2400
ATTTTTTTCC CAAAAGATGG TATATACCAA GTTAAAGACA GGCTATTATA AATTAGACT	2460
GATTGGTGGT ATATTACGGA AATACCGAAC CTTAGGGAT ACTTCCGTGT AAGGGCTTTG	2520
ATGCCAGCAT CCTTGATCA GTACTGAAGT CAGTTCCATC CGTAAATAT GTAAAGGTAA	2580
CTGGCAGCTG CTCTATTTAA TGAAAGCACT TTTACCGCAT TTTGTTAGAC TAAATTTGA	2640
TTGTGATACA TTGAACAAAA TGGAACTCAT TTTTTTTTAA GGAGTAAAGA TTTTAAATTC	2700

35

36

TGTGATTGTC TGTATGTGTC TTGAACTGT AAAGCTTTTA TGA CTCTAAT ATTAATCTCT 2760  
 TAAATGAAAT TAAAAGGCAA AAGAACATGA TTGAGCTTAA ATGATCATTT CTTCTGCAG 2820  
 TGATTCTTGG ATTGTTTCT CATGTATTG AAAAAAAAA AAAAAA 2866

。

【0148】

配列番号：5

配列の長さ：1704

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC	45
Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
1 5 10 15	
GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG	90
Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu	
20 25 30	
ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA	135
Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT	180
Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val	
50 55 60	
GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGC AAA GCG TTT ATT	225
Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile	
65 70 75	
GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA	270
Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val	
80 85 90	
AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTC TGT CTT GTG ATG GAA	315
Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu	
95 100 105	
TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTC CTG CAT GGT GCT GAA	360
Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu	
110 115 120	
CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA	405
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
125 130 135	
CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA	450
Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu His Ser Met Gln Pro Lys	
140 145 150	
GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT	495
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val	
155 160 165	
GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT	540
Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys	
170 175 180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG	585
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp	

	185	190	195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT ACT AAT TAC AGT GAA AAA TGT				630
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys				
	200	205	210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACC CGT				675
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg				
	215	220	225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG				720
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met				
	230	235	240	
TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA				765
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu				
	245	250	255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT				810
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp				
	260	265	270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATC ACT				855
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr				
	275	280	285	
CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT				900
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr				
	290	295	300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT				945
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser				
	305	310	315	
ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACC AGT AAC AAA				990
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys				
	320	325	330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT				1035
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile				
	335	340	345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG				1080
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln				
	350	355	360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT				1125
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser				
	365	370	375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT				1170
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala				
	380	385	390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GCC TAT				1215
Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Ala Tyr				
	395	400	405	
TCC AAG CCT AAA CGG GGC CAC CGT AAA ACT GCT TCA TTT GGC AAC				1260
Ser Lys Pro Lys Arg Gly His Arg Lys Thr Ala Ser Phe Gly Asn				
	410	415	420	
ATT CTG GAT GTC CCT GAG ATC GTC ATA TCA GGC AAC GGA CAG CCA				1305
Ile Leu Asp Val Pro Glu Ile Val Ile Ser Gly Asn Gly Gln Pro				
	425	430	435	
AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA ACA GAA CCT				1350

Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro	
440 445 450	
GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC AGA ATG ATT	1395
Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val Arg Met Ile	
455 460 465	
ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA AGT CAT CCA	1440
Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg Ser His Pro	
470 475 480	
TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA GAT AAC TCC	1485
Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser Asp Asn Ser	
485 490 495	
ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA CAG CAA GAA	1530
Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu Gln Gln Glu	
500 505 510	
CTA GTT GCA GAA CTG GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA	1575
Leu Val Ala Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr	
515 520 525	
TCT CGC CTG GTA CAG GAA CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA	1620
Ser Arg Leu Val Gln Glu His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys	
530 535 540	
GGC CTT TCT ACT TAC TAC CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC	1665
Gly Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val	
545 550 555	
ATC AGA ACT CAG CAG CAG AAA CGA CAA GGC ACT TCA TGA	1704
Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
560 565 567	

## 【0149】配列番号：6

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成プライマー）

配列

TTCCAAGCTT ATGCCGGCGC AGAGGAGGAG

。

## 【0150】配列番号：7

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成プライマー）

配列

TCCGAATTC CTACGGTGCT GTCACCACGC

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 マウスTAK1及び3種のヒトTAK1（hTAK1a、hTAK1b及びhTAK1c）のアミノ酸配列の比較を示す図。

【図2】 ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞のNF- $\kappa$ B活性化（ゲルシフトアッセイにお

けるNF- $\kappa$ Bの核移行）を示す電気泳動の結果を示した図。

30 【図3】 ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞のNF- $\kappa$ B活性化（レポーターアッセイにおけるルシフェラーゼ活性）を示した図。

【図4】 変異型ヒトTAK1を発現させた細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の抑制（ゲルシフトアッセイ（A）及びレポーターアッセイ（B）の結果）を示した図。

【図5】 ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分の免疫プロットの結果（細胞内でのTAK1とTAB1の相互作用）を示した図。

40 【図6】 ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分のキナーゼアッセイの結果（TAK1による自己リン酸化TAB1のリン酸化）を示した図。

【図7】 ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分および細胞溶解液の免疫プロットの結果（細胞内でのTAK1とIKKの相互作用）を示した図。

【図8】 ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たIKKを含む免疫沈降画分のIKKキナーゼアッセイの結果（TAK1によるIKK複合体の活性化）を示した

図。

能を示した模式図。

【図9】 NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機

【図1】

mTAK1	: MSTASAAASSSSSSSSAGEMI EAPSQVLNFEIDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV	60
hTAK1a	: MSTASAAASSSSSSSSAGEMI EAPSQVLNFEIDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV	60
hTAK1b	: MSTASAAASSSSSSSSAGEMI EAPSQVLNFEIDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV	60
hTAK1c	: MSTASAAASSSSSSSSAGEMI EAPSQVLNFEIDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV	60
mTAK1	: AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNPUCLVMEYAEAGGSLYNVLHGAE	120
hTAK1a	: AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNPUCLVMEYAEAGGSLYNVLHGAE	120
hTAK1b	: AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNPUCLVMEYAEAGGSLYNVLHGAE	120
hTAK1c	: AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNPUCLVMEYAEAGGSLYNVLHGAE	120
mTAK1	: PLFYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKAL IHRDLKPPNLLVAGGTVLKICDFGTAC	180
hTAK1a	: PLFYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKAL IHRDLKPPNLLVAGGTVLKICDFGTAC	180
hTAK1b	: PLFYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKAL IHRDLKPPNLLVAGGTVLKICDFGTAC	180
hTAK1c	: PLFYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKAL IHRDLKPPNLLVAGGTVLKICDFGTAC	180
mTAK1	: DIQTHMTNNKGSAAANMAPEVFECSNYSEKCDVPSWGIILWEVITRKKPFDEIGGPAFRIM	240
hTAK1a	: DIQTHMTNNKGSAAANMAPEVFECSNYSEKCDVPSWGIILWEVITRKKPFDEIGGPAFRIM	240
hTAK1b	: DIQTHMTNNKGSAAANMAPEVFECSNYSEKCDVPSWGIILWEVITRKKPFDEIGGPAFRIM	240
hTAK1c	: DIQTHMTNNKGSAAANMAPEVFECSNYSEKCDVPSWGIILWEVITRKKPFDEIGGPAFRIM	240
mTAK1	: WAVHNGTRPPLIKNLFPKPIESLNTRCWSKDPQRPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY	300
hTAK1a	: WAVHNGTRPPLIKNLFPKPIESLNTRCWSKDPQRPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY	300
hTAK1b	: WAVHNGTRPPLIKNLFPKPIESLNTRCWSKDPQRPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY	300
hTAK1c	: WAVHNGTRPPLIKNLFPKPIESLNTRCWSKDPQRPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY	300
mTAK1	: PCQYSDEGQNSATSTGSPNDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLSKLLKNQAKQQ	360
hTAK1a	: PCQYSDEGQNSATSTGSPNDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLSKLLKNQAKQQ	360
hTAK1b	: PCQYSDEGQNSATSTGSPNDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLSKLLKNQAKQQ	360
hTAK1c	: PCQYSDEGQNSATSTGSPNDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLSKLLKNQAKQQ	360
mTAK1	: SESGRSLGASRGSSVESLEPFTSEGRMSADMSEIEARIAATA-----	403
hTAK1a	: SESGRSLGASRGSSVESLEPFTSEGRMSADMSEIEARIAATT-----	403
hTAK1b	: SESGRSLGASRGSSVESLEPFTSEGRMSADMSEIEARIAATTAYSKPKRGHRTASFGN	420
hTAK1c	: SESGRSLGASRGSSVESLEPFTSEGRMSADMSEIEARIAATTAYSKPKRGHRTASFGN	420
mTAK1	: -----GNGQPRRSIQDLTVTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSQPTSEKPTRSHP	453
hTAK1a	: -----GNGQPRRSIQDLTVTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSQPTSEKPTRSHP	453
hTAK1b	: ILQVPEIVISGNGQPRRSIQDLTVTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSQPTSEKPTRSHP	480
hTAK1c	: ILQVPEIVISGNGQPRRSIQDLTVTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSQPTSEKPTRSHP	480
mTAK1	: WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCNMAQEYMKVQTEI	513
hTAK1a	: WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCNMAQEYMKVQTEI	513
hTAK1b	: WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCNMAQEYMKVQTEI	540
hTAK1c	: WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQ-----	508
mTAK1	: ALLLQKQELVAELDQDEKDDQNTSRLVQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKQLEVIRSQQQ	573
hTAK1a	: ALLLQKQELVAELDQDEKDDQNTSRLVQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKQLEVIRSQQQ	573
hTAK1b	: ALLLQKQELVAELDQDEKDDQNTSRLVQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKQLEVIRSQQQ	600
hTAK1c	: -----QELVAELDQDEKDDQNTSRLVQEHKKLLDENKSLSTYYQQCKKQLEVIRSQQQ	561
mTAK1	: KRQGTS	579
hTAK1a	: KRQGTS	579
hTAK1b	: KRQGTS	606
hTAK1c	: KRQGTS	567

(mTAK1はマウスTAK1を表す。)

【図2】

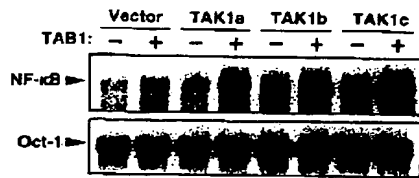


図2 TAK1を発現させた細胞におけるNF-κB活性化 (ゲルシフトアッセイ)

【図3】

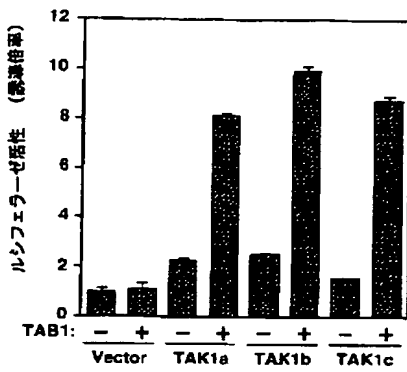


図3 TAK1を発現させた細胞におけるNF-κB活性化 (レポーターアッセイ)

【図5】

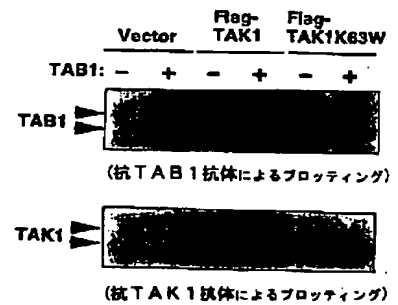


図5 TAB1とTAK1の相互作用 (抗フラッグ免疫沈降成分の免疫ブロッティング)

【図4】

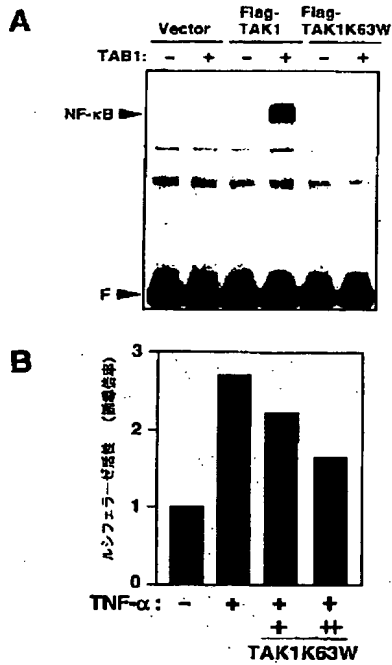


図4 変異型TAK1を発現させた細胞におけるNF-κB活性化の抑制 (A) ゲルシフトアッセイ (B) レポーターアッセイ

【図6】

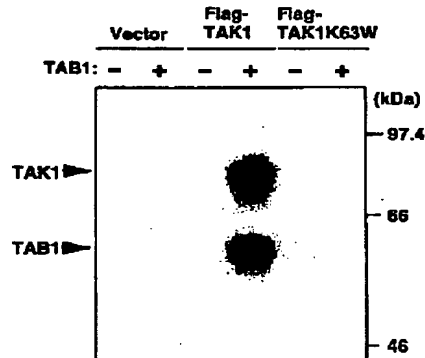


図6 TAK1による自己リン酸化とTAB1のリン酸化 (抗フラッグ免疫沈降成分のキナーゼアッセイ)

【図7】

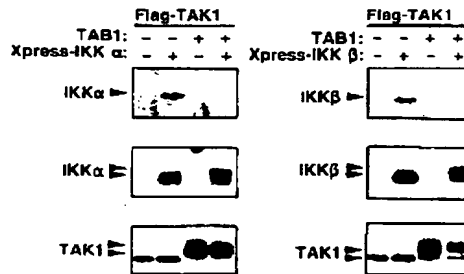


図7 TAK1とIKKの相互作用

上段: 抗Flag免疫沈降成分/抗Xpress抗体によるブロッティング  
 中段: 細胞溶解液/抗Xpress抗体によるブロッティング  
 下段: 抗Flag免疫沈降成分/抗TAK1抗体によるブロッティング

【図8】

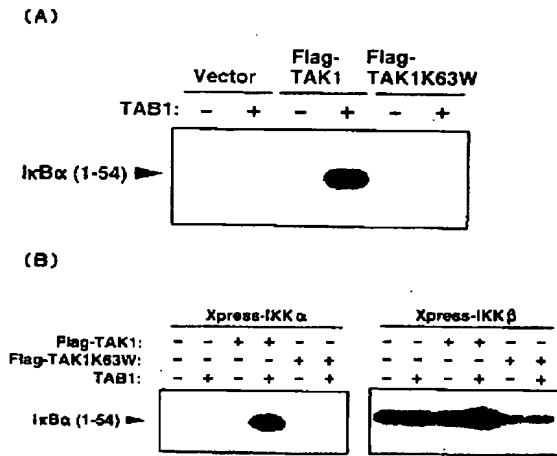
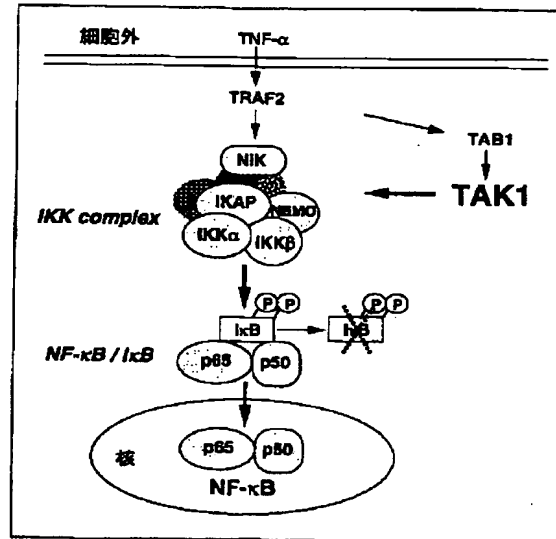


図8 TAK1によるIKK複合体の活性化

【図9】

NF-κB活性化経路におけるTAK1の機能



(TRAF2: TNF-α receptor associated factor 2  
 IKK: IκB kinase  
 NIK: NF-κB inducing kinase  
 NEMO: NF-κB essential modulator  
 IKAP: IKK complex associated protein)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> 識別記号

C 1 2 N	9/99	
C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	
	33/50	Z N A
	33/566	
// C 1 2 N	15/09	Z N A
C 1 2 Q	1/68	Z N A
(C 1 2 N	15/09	Z N A
C 1 2 R	1:91)	

F I テーマコード(参考)

C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	Z
	33/50	Z N A P
	33/566	
C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	5/00	B
	15/00	Z N A A

(72) 発明者 長谷川 浩  
 大阪府大阪市淀川区三津屋中1丁目5番9号



Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA20 FB03  
4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 DA06  
DA12 EA04 HA08 HA11  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ22  
QQ27 QQ42 QQ52 QQ91 QQ95  
QR07 QR33 QR48 QR55 QR57  
QR59 QR62 QR76 QR80 QS02  
QS16 QS24 QS25 QX07  
4B065 AA93Y AB01 CA44 CA46  
4C084 AA17 ZB071 ZB072 ZB111  
ZB112 ZC202